

DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS SEMIVOLÁTILES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



AUTOR: SARA GARGALLO ESCRIG

TUTOR UJI: ROQUE SERRANO

TUTOR EMPRESA: JOSE LUIS ARANDA (IPROMA S.L)



IProma
laboratorio y asesoría

ÍNDICE:

1. OBJETIVOS	3
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. La empresa	3
2.2. El agua es... ..	4
2.3. Compuestos orgánicos semivolátiles.....	6
2.4. Técnica de extracción.....	10
2.5. Técnica de análisis	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
3.1. Patrones y reactivos	17
3.2. Procedimiento experimental.....	20
3.2.1. Método 1(GC/MS)	20
3.2.2. Método 2 (GC/MS/MS)	25
4. RESULTADOS.....	28
5. CONCLUSIÓN.....	37
6. AGRADECIMIENTOS	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38

1-. OBJETIVOS

Los objetivos generales de este proyecto, son:

- Conocer la investigación actual en el campo de las técnicas cromatográficas.
- Resolver problemas analíticos en el laboratorio.
- Ser capaz de organizar y planificar el trabajo en el laboratorio.
- Saber aplicar los conocimientos y habilidades adquiridos durante el curso.
- Familiarizarse con el mundo de la empresa.
- Ser capaz de desarrollar un trabajo de investigación original.

Los objetivos específicos en este caso, son:

- Aprendizaje sobre la preparación de muestras para análisis de contaminantes orgánicos.
- Determinaciones tanto por GC-MS como GC-MS/MS.
- Aprendizaje sobre los controles de calidad de los ensayos.

2-. INTRODUCCIÓN

2.1. La empresa

La empresa donde se realiza el presente trabajo es IPROMA¹, especializada como laboratorio de análisis y asesoramiento técnico en medio ambiente e higiene industrial, ofrece sus servicios de análisis de aguas, análisis de suelos contaminados, sedimentos, biota, indicadores biológicos en

aguas, análisis de calidad del aire, higiene industrial, etc., incluyendo toma de muestras, mediciones “in situ” y la realización de estudios y consultoría técnica.

Sus laboratorios de análisis están equipados para la determinación de compuestos que requieren una elevada especialización, con unos niveles de detección, incertidumbre y buenos servicios a sus clientes.

Los objetivos de la empresa son los siguientes:

Misión: Ofrecer un servicio de calidad especializado en análisis y asesoramiento medioambiental e higiene industrial basado en la experiencia y profesionalidad de nuestro equipo humano, en la estrategia de innovación tecnológica y procesos, para satisfacer las necesidades, las expectativas y los requisitos de nuestras partes interesadas, siempre de forma responsable con nuestro entorno.



Figura 1: Logo empresa

Visión: Ser una empresa referente en análisis y consultoría medioambiental y de higiene industrial en el ámbito nacional utilizando las herramientas necesarias de innovación tecnológica que permitan desarrollar e incorporar nuevas tecnologías y transferir nuestra experiencia y conocimientos adquiridos al ámbito internacional.

Para **IPROMA** la Calidad es un factor imprescindible para avalar el servicio prestado como laboratorio de análisis y asesoramiento medioambiental.

Por todo ello la empresa tiene implantado un sistema de calidad, medio ambiente y prevención que afecta a todas sus actividades y cuyas declaraciones por parte de la dirección de la empresa se adjuntan en los apartados correspondientes.

El sistema de calidad de **IPROMA** es avalado por las numerosas acreditaciones y reconocimientos que tiene la empresa, destacando las acreditaciones de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) para análisis medioambientales (aguas, suelos, residuos, sedimentos, atmósfera, higiene industrial, etc.) de acuerdo con la norma UNE-EN-ISO 17025 y como entidad de inspección en aguas de acuerdo con la norma UNE-EN-ISO 17020, así como el Título de Entidad Colaboradora de la Administración Hidráulica, junto con otros títulos que se detallan en el apartado de Homologaciones y Títulos.

2.2. El agua es....

El agua es un recurso natural, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente.

La aparición de elementos "no deseables" y tóxicos, y la variación en las concentraciones de los constituyentes comunes, tiene su origen en el denominado "ciclo del agua" (Figura 2). En alguna parte de este ciclo, en el cual confluyen distintos compartimentos ambientales y actividades humanas, es donde se produce la contaminación del agua, o mejor dicho, la alteración de su calidad. De acuerdo con este ciclo, las principales vías de entrada de contaminantes en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, entre las que se incluyen las urbanas, industriales, y las de origen agrícola o ganadero. La prevalencia de una u otra depende en gran medida del tipo de contaminación de que se trate y del nivel de depuración o atenuación natural (si existe) que experimentan².

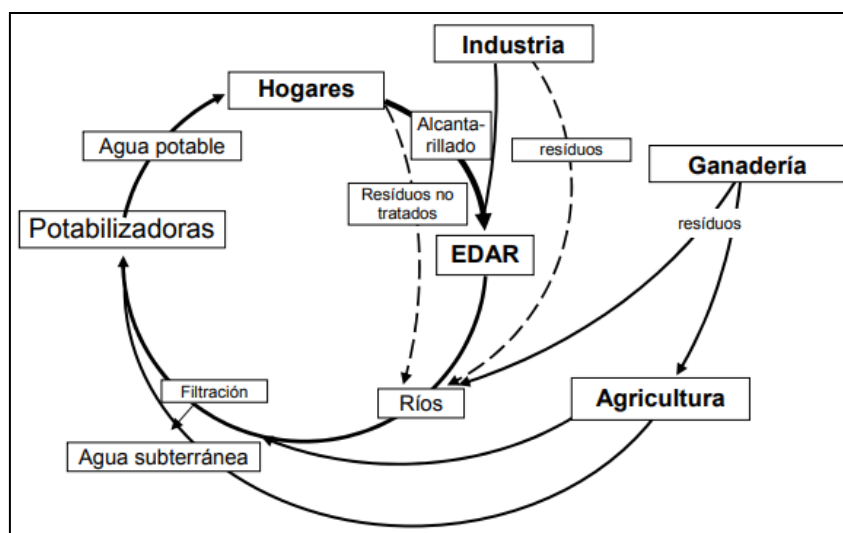


Figura 2: Ciclo del agua (L. Damià Barcelò y MJ Lopez de Alda. Contaminación y calidad química del agua. Instituto de investigaciones químicas y ambientales)

Los efectos que la contaminación química del agua produce son múltiples; entre los más importantes cabe destacar²:

1. Acción tóxica y cancerígena.
2. Incidencia sobre la producción de alimentos.
3. Limitación del uso del agua con fines recreativos.
4. Reducción de las posibilidades de su uso industrial y agropecuario.

Los riesgos que siguen a la contaminación del agua son difíciles de precisar, ya que muchas veces las dosis tóxicas sobre las cuales se trabaja son muy pequeñas, y el problema aún se complica más por la presencia simultánea de diversos contaminantes.

La determinación de residuos de plaguicidas en el medio ambiente, muestras de aguas y suelo e incluso en productos agrícolas ha sido un tema importante durante muchos años debido a su riesgo potencial para la salud humana, la persistencia y la tendencia a bioacumularse.

Para muestras de agua, los métodos analíticos generalmente incluyen extracción y etapas de enriquecimiento para determinar los residuos de plaguicidas en nivel muy bajo.

Este trabajo se basa en la determinación de contaminantes orgánicos semivolátiles en aguas de consumo, cabe decir también que los métodos explicados a continuación se puede determinar los contaminantes en diferentes matrices como continental, residual e incluso de mar.

2.3. Contaminantes orgánicos semivolátiles

Los contaminantes orgánicos están compuestos por plaguicidas, retardantes de llama y HPA's.

2.3.1. Plaguicidas:

Los plaguicidas son productos químicos usados para controlar plagas (insectos, ácaros, hongos, bacterias, virus, nematodos, caracoles, roedores y malezas) que afectan los cultivos. En muchas ocasiones el uso de plaguicidas no es indispensable, pudiéndose reemplazar por otras formas de control, basadas en técnicas de manejo integrado de plagas. En la agricultura convencional juegan un papel clave para alcanzar y mantener niveles altos de productividad y rentabilidad. Sin embargo el uso de plaguicidas genera daños muy grandes para la salud y el medio ambiente ^{3,4,5}.

Dentro del grupo de plaguicidas podemos encontrar en las muestras los siguientes analitos:

- **ORGANOFOSFORADOS:** Los compuestos organofosforados son ésteres del ácido fosfórico y de sus derivados, que comparten como característica farmacológica la acción de inhibir enzimas con actividad esterásica, más específicamente de la acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas, lo que genera una acumulación de acetilcolina y como consecuencia se altera el funcionamiento del impulso nervioso. Estos compuestos son liposolubles y volátiles, características que facilitan su absorción; su toxicidad es variable (I, II, III), y los efectos farmacológicos varían de acuerdo al grado de toxicidad y vía de entrada en el organismo. Los plaguicidas organofosforados, un grupo de compuestos altamente tóxicos, son muy utilizados especialmente en el campo de la agricultura. Los más usados pertenecen los grupos fosfatos, los fosfanatos y sus derivados azufrados ^{6,7}.

- | | |
|------------------|-------------------|
| - Diclorofention | - Tetraclorvinfos |
| - Fenclorfos | - Metidation |
| - Clorpirifos | - Fenamifos |
| - Fenitrothion | - Cadusafos |
| - Etil Paration | - Etion |
| - Metil Bromofos | - Metil Paration |
| - Etil Bromofos | - Etoprofos |
| - Clorfenvinfos | - Entre otros.... |

- **ORGANOCOLORADOS:** Los insecticidas organoclorados, son compuestos químicos sintéticos de amplio espectro, cuya propiedad más destacada es su alta estabilidad química, muy solubles en grasas e insolubles en agua ^{8,9}.

A través de residuos presentes en los productos agrícolas, o como resultado del uso doméstico para eliminar insectos caseros; los insecticidas organoclorados pueden llegar al hombre, y en forma indirecta a través de la cadena alimenticia en los productos de origen animal con la leche y la carne; que en este último caso además de ingerir los residuos del insecticida propiamente dicho, se ingieren también todos los metabolitos que se hayan formado ¹⁰.

Los principales insecticidas sintéticos organoclorados ^{11,12} son:

- | | |
|--------------------|--------------|
| - Trifluralin | - Aldrina |
| - Alfa-HCH | - Dieldrina |
| - Hexaclorobenceno | - Alaclor |
| - Beta-HCH | - Metolaclor |
| - Lindano | - Isodrin |
| - Delta-HCH | - DDT |
| - Heptaclor | - DDD |

- **ORGANONITROGENADOS:**

Se basa en un grupo de herbicidas llamados triazinas (Figura 3). A pesar de su gran uso se sabe relativamente poco acerca de sus posibles efectos en humanos y de su mecanismo en acción. Parece ser que ejercen un efecto disruptor endocrino a nivel del SNC, concretamente del hipotálamo responsable de las alteraciones en los niveles plasmáticos de la hormona LH y prolactina ^{13,14}.

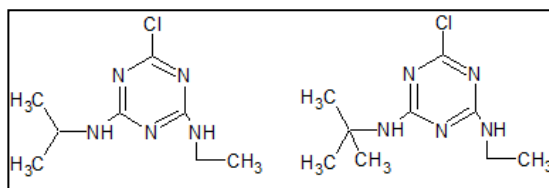


Figura 3 Ejemplo de compuestos organonitrogenados

- | | |
|--------------|-----------------|
| - Atracina | - Ametricina |
| - Simacina | - Terbutrina |
| - Trietacina | - Terbutilacina |
| - Serbumeton | - Terbumeton |

2.3.2. Retardantes de llama:

Los retardantes de llama hacen referencia a una variedad de sustancias que se añaden a los materiales combustibles para evitar incendios o disminuir la propagación del fuego y proporcionar un tiempo de escape adicional.

El término “retardante de llama” se refiere a una función, no a una familia de productos químicos. Una variedad de diferentes composiciones químicas, con diferentes

propiedades y estructuras moleculares, actúan como retardantes de llama y estos productos químicos se suelen combinar para lograr la eficacia ¹⁵.

Entre ellos destacamos:

- **PCBs (BIFENIL POLICLORINADOS):** Los PCB son compuestos químicos y térmicamente estables, insolubles en agua, no son inflamables, no conducen la electricidad, tienen baja volatilidad a temperaturas normales, se degradan a altas temperaturas, no son biodegradables y son bioacumulables.

Precisamente, algunas de estas propiedades hicieron que los PCB fueran importantes para el sector industrial y comercial. Se usaron como enfriadores y lubricantes, principalmente para fluidos dieléctricos de condensadores, transformadores y balastos de luces fluorescentes; en sistemas hidráulicos de equipos de minería como adhesivos y lubricantes; en la industria de la impresión en tintas, selladores en empaques, pinturas y barnices, y en el papel calca; en la construcción en guarniciones de frenos y asfalto, en tuberías de gas, edificios, naves y en la investigación ^{16,17}:

- | | |
|-----------|------------------|
| - PCB-28 | - PCB-138 |
| - PCB-52 | - PCB-153 |
| - PCB-101 | - PCB-180 |
| - PCB-118 | - Entre otros... |

Estos químicos aún persisten en el aire, agua y suelo, por lo que se bioacumulan y se transfieren dentro de la cadena alimenticia ^{18,19}.

- **BDEs:** Los PBDE (figura 4b) tienen una estructura molecular similar a los PBB (figura 4a) y PCB (figura 4c). Como se muestra en la ilustración 4, se

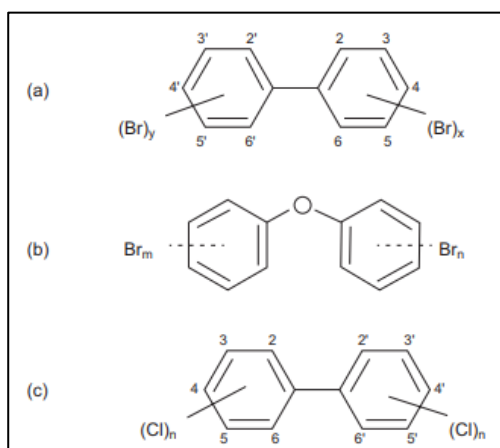


Figura 3: Estructura química de: a) Bifenilos polibromados (PBB). b) Éteres de bifenilos polibromados (PBDE) y c) Bifenilos policlorados (PCB).

caracterizan por tener un alto peso molecular y un rango de K_{ow} de 5 a 10, son compuestos hidrofóbicos bioacumulables y resistentes a la biodegradación. Los PBDE se emplean como retardantes de flama y son aplicados en la industria de los electrónicos, electrodomésticos, textiles, muebles, alfombras, materiales de construcción y polímeros con la finalidad de hacer más lento el consumo del producto al estar en contacto con el fuego ^{20,21,22}. Como consecuencia del desgaste de los materiales que los contienen y de la aplicación excesiva de

estos químicos, grandes cantidades de PBDE son liberados al ambiente, acumulándose en sedimentos y organismos vivos, incluyendo a los humanos²³. Los PBDE se han asociado con tumores, toxicidad neurológica y desestabilización del sistema hormonal tiroideo, efectos similares a los anteriormente observados por la toxicidad de los PCB. Los PBDE se consideran potentes disruptores hormonales causantes de déficit del neurodesarrollo y posiblemente de cáncer²⁴.

- | | |
|-----------|-----------|
| - BDE-47 | - BDE-28 |
| - BDE-99 | - BDE-153 |
| - BDE-100 | - BDE-154 |

- **CLOROALCANOS:** Los cloroalcanos (C10-13), también denominados cloroparafinas (SCCP) son una mezcla compleja de hidrocarburos que tienen entre 10 a 13 átomos de carbono, en los que su peso molecular está compuesto por un 50-70% de cloro. Son líquidos amarillentos, aceitosos y espesos, con un punto de fusión muy similar. Hierven a más de 200° C, y en el proceso, se descomponen liberando cloruro de hidrógeno (HCl).

Se caracterizan por ser insolubles en agua, pero se disuelven bien en la mayoría de los disolventes orgánicos no polares, como el keroseno. Poseen un cierto olor característico, y no son inflamables.

Se utilizan principalmente en la industria metalúrgica formando parte de los metales industriales en fluidos usados, aunque también como aditivo en la fabricación del caucho, sobre todo para las bandas transportadoras²⁵.

2.3.3. **HPA's (Hidrocarburos aromáticos policíclicos:**

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (HPAs) son un conjunto de compuestos orgánicos formados por carbono e hidrógeno (Figura 5), que se caracterizan por contener dos o más anillos de benceno unidos entre sí, que pueden existir en varias disposiciones isoméricas, y son siempre estructuras polinucleares de tipo aromático (también se les conoce con el nombre de hidrocarburos polinucleares).

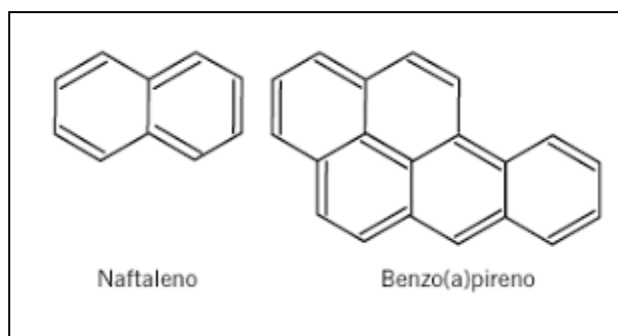


Figura 5: Ejemplo de los HPAs

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos, a los que se denominarán en adelante (HPAs), son de difícil remoción, considerados contaminantes de interés, tanto para el

ambiente como para la salud humana pues son compuestos recalcitrantes y potencialmente carcinogénicos con alta capacidad de bioacumulación en las cadenas tróficas ²⁶.

Los principales HPAs de análisis son:

- | | |
|-------------------------|---------------------------|
| - Acenafteno | - Criseno |
| - Acenaftileno | - Dibenzo-antraceno |
| - Antraceno | - Fluoranteno |
| - Benzo[a]antraceno | - Fluoreno |
| - Benzo[a]pireno | - Fenantreno |
| - Benzo[e]pireno | - Indeno[1,2,3-c,d]pireno |
| - Benzo[b]fluoranteno | - Naftaleno |
| - Benzo[g,h,i]perileno | - Pireno |
| - Benzo[j]fluoranteno | - Entre otros.... |
| - Benzo[k]fluoranteno | |
| - Ciclopenta[c,d]pireno | |

2.4. Técnica de extracción:

La técnica de extracción de estos contaminantes es por medio de una barra agitadora por desorción térmica (SBSE), es una técnica sencilla en cuanto a preparación de muestra para compuestos en muestras acuosas, como es nuestro caso. El dispositivo de extracción llamado Twister® (Figura 6), se compone de un imán de carbono encerrado en un tubo de vidrio recubierto por una película gruesa de polidimetilciclosiloxano (PDMS) ²⁷.

La extracción sorbedora de la barra de agitación se aplicó por primera vez en el medio ambiente análisis. La principal ventaja de la técnica es que puede ser aplicado tanto a compuestos orgánicos volátiles (VOC) como a compuestos semivolátiles ²⁷. La mayoría de las aplicaciones se ocupan de compuestos semivolátiles, eluyendo después a una columna en GC.

Esta nueva técnica de tratamiento de muestra se ha utilizado con éxito para la extracción analítica de varios compuestos, como hormonas, pesticidas, HAP y PCB en aire, suelo y varias matrices líquidas ^{28,29}.



Figura 6: Esquema Twister

Las barras de agitación se recubrieron con una capa (típicamente 0,5-1 mm de grosor) de polidimetilsiloxano y la barra agitadora se usa para remover muestras acuosas, extrayendo y enriqueciendo solutos en el

recubrimiento de polidimetilsiloxano. Este dispositivo muestra una mayor recuperación de compuestos muy volátiles emitidos por el material vegetal, obteniendo recuperaciones más altas para solutos más polares en muestras acuosas ^{28,30}.

El polidimetilsiloxano (PDMS) es la fase de extracción más utilizada. Esta fase es conocida como fase estacionaria en cromatografía de gases (GC), es termoestable, se puede utilizar en un amplio rango de temperatura (actuar como un líquido entre -20 y 320 °C), y tiene interesantes propiedades de difusión.

Las ventajas de esta extracción usando PDMS incluyen enriquecimiento predecible, la ausencia de efectos de desplazamiento, inercia y desorción térmica rápida a temperaturas suaves.

A mediados de la década de 1980, diferentes grupos de investigación describieron la extracción de compuestos orgánicos de un gas acuoso o fase utilizando trampas tubulares abiertas (OTT) recubiertas con películas de polidimetilsiloxano grueso. Sin embargo, es práctico pero tiene limitaciones, como baja capacidad de muestra y bajo avance volúmenes ^{31,32,33,34}.

Después de la extracción, se retira la barra de agitación, se seca el twister con un tejido limpio de papel para eliminar las gotas de agua, se introduce en una unidad térmica de desorción. En algunos casos, se recomienda enjuagar la barra de agitación ligeramente con agua destilada para eliminar los azúcares adsorbidos, proteínas u otros componentes de muestra. Este paso evitará la formación de material no volátil durante el paso en el TDU. Cabe decir, que el enjuague no causa pérdida de solutos, porque los absorbidos los solutos están presentes dentro de la fase de polidimetilsiloxano ²⁸.

Típicamente, la barra de agitación se coloca en un vial llamado “liner”, donde los analitos se desorben térmicamente, se focalizan en el interior del inyector y se transfieren a la columna capilar de CG.

Se ha demostrado³⁵ que las barras de agitación cargadas pueden estar almacenada a 4 °C durante 1 semana sin pérdida de solutos. Esto abre perspectivas interesantes para el muestreo y la extracción in situ.

Después de la desorción térmica o líquida, las barras de agitación pueden volver a reutilizarse; ya que por lo general, la vida útil de una barra de agitación individual es de más de 100 usos sin importar que tipo de agua tengamos en la matriz, aunque se lleva una distinción si se utiliza diferentes procesos de extracción y/o diferentes equipos de análisis.

Tabla 1 Ventajas y aplicaciones. Twister Gerstel y F. David, Pat Sandra, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 54.

VENTAJAS	APLICACIONES
Límite de detección 1000 veces más bajo que SPME	<i>Alimentos</i>
Cuantificable a rango lineal	<i>Aromas y perfumes</i>
Requiere dedicación analítica mínima	<i>Análisis de entornos de agua y desechos de agua</i>
La desorción térmica y el análisis GC/MS o GC/MSMS se realizan automáticamente.	<i>Biomedicina, incluyendo fluidos orgánicos</i>
Desorción térmica rápida a temperaturas suaves.	<i>Control de calidad</i>
	<i>Análisis de residuos</i>

Este procedimiento debe ser optimizado para cada aplicación ya que diferentes variables podrían afectar su eficiencia como una técnica de extracción; tales variables incluyen la muestra y volúmenes de polímeros, la composición de la matriz y la fisicoquímica propiedades de los analitos considerados. De hecho, SBSE es menos efectivo para polar que para más analitos hidrofóbicos²⁷. Como se indica en la Tabla 1 las diferentes ventajas y las aplicaciones que puede tener esta técnica.

Las eficiencias de extracción de polar compuestos a menudo se pueden mejorar mediante la adición de NaCl, ya que reduce su solubilidad en agua, como se ha evaluado previamente para triazinas en muestras de agua dulce³⁶. Estudios previos han optimizado la eficiencia de la técnica SBSE para agua dulce muestras, que tienen una fuerza iónica menor que la de aguas marinas^{36,37}. Por lo tanto, también es necesario evaluar si este efecto podría mejorar la extracción en muestras de agua de mar.

2.5. Técnica de análisis:



Figura 7 Equipo Gerstel utilizado en el proyecto

Una prestación especial del Twister (la técnica de extracción explicada anteriormente) es que, después de la agitación, ésta puede transferirse a la unidad de desorción térmica TDU. Esto significa que la desorción térmica, la cromatografía y la subsiguiente detección de los compuestos orgánicos sobre la capa de PDMS se realizan directamente sobre la barra.

La cromatografía es un método físico de separación para la caracterización de mezclas

complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia; es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes³⁸.

El esquema general de una cromatógrafo de gases se muestra en la Figura 8.

Donde los componentes son:

- Fuente de gas
- Sistema de inyección
- Horno y columna cromatográfica
- Sistema de detección
- Sistema de registro

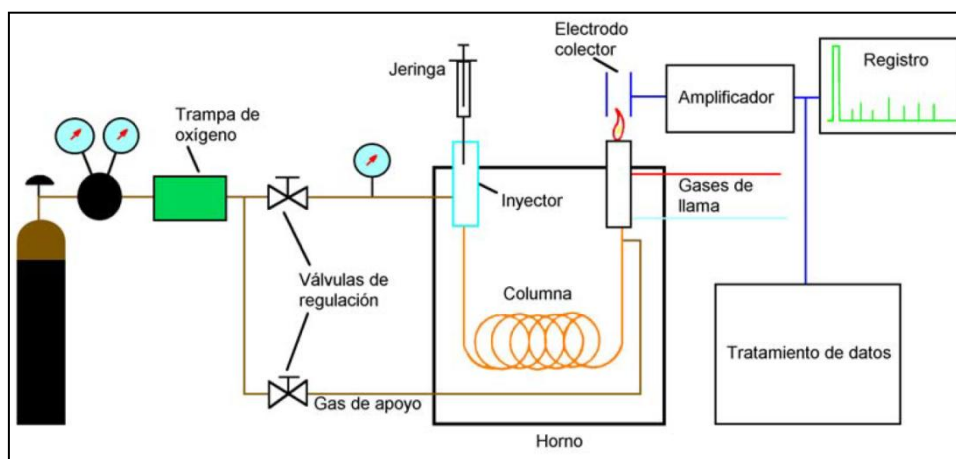


Figura 8 Esquema de un cromatógrafo de gases

Fuente de gas: Gaseosa, líquida o fluido supercrítico (potencia disolvente de los fluidos a temperaturas y presiones superiores al punto crítico). Estas fases son generalmente gases inertes como Helio, Argón o Nitrógeno. El gas portador lleva las moléculas del analito a través de la columna, este movimiento es inhibido por la adsorción que presenta el analito tanto en las paredes de la columna cuanto en los materiales empaquetados en la misma³⁹.

Sistema de inyección (Figura 9): La técnica de desorción térmica se utiliza para el análisis de compuestos orgánicos volátiles en muestras gaseosas. Las muestras en fase gas se recolectan en tubos con rellenos específicos para los compuestos que queremos analizar, posteriormente los tubos de desorción se introducen en los equipos de desorción térmica que calientan los tubos liberando los VOC's y SemiVOC's presentes, dichos VOC's se vuelvan a concentrar en trampas de focalización que incorporan los equipos, una vez focalizados las trampas se calientan rápidamente liberando los compuestos orgánicos volátiles directamente al inyector de GC o GC/MS. Disponemos de sistemas de desorción térmica que permiten el análisis de VOC's y SVOC's en

muestras captadas en bolsas, canisters o en muestras ambientales con captación directa y on-line ^{36,37}.

Un equipo de desorción térmica consta de un horno donde la muestra es desorbida de los tubos de muestreo a elevada temperatura bajo una corriente de gas portador (helio); una vez desorbidos los vapores de la muestra, estos son retenidos en una trampa criogénica hasta la finalización del proceso de desorción, efectuándose la inyección en este momento por medio de un calentamiento muy rápido de la trampa fría ⁴⁰.

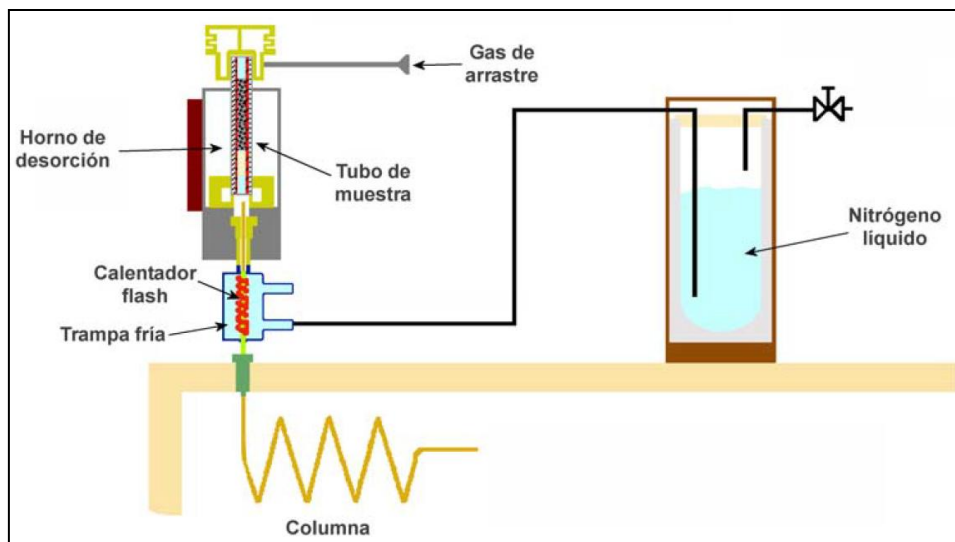


Figura 9 Esquema inyector TDU

Horno y columna cromatográfica: En el interior del horno se sitúa la columna, donde se debe tener una buena regulación de la temperatura. La columna se conecta en un extremo al puerto de inyección, y en el otro al detector y debe estar en el centro del horno sin tener contacto con las paredes.

La separación de la mezcla se realiza dentro de la columna, por lo tanto, es la parte más importante del cromatógrafo.

Cabe decir que la columna es el auténtico elemento de separación de los componentes de la muestra, es decir, una mala elección de columna, una columna deteriorada o en unas condiciones de trabajo inadecuadas, nunca permitirán obtener buenos resultados aunque se disponga del mejor equipo.

Una columna para cromatografía de gases, está formada por un tubo, que puede ser de diversos materiales (preferiblemente inertes), dentro del cual se encuentra la fase estacionaria.

Las columnas están hechas de cobre, acero inoxidable y enrolladas. Estas tienen una longitud de 1-6 m. de longitud y de 2-4 mm. de diámetro. Según se encuentre en ella

distribuida la fase estacionaria y el valor que alcance la relación de fases se originan los diferentes tipos de columnas ⁴¹.

Sistema de detección: Una vez que los analitos de la muestra han sido separados por la columna, se hace preciso disponer a la salida de ésta de un sistema de detección, capaz de señalar la elución de un componente de la muestra y ofrecer, al mismo tiempo, una señal proporcional a la cantidad de analito que pasa a través de él.

Los detectores más utilizados en cromatografía de gases son de tipo diferencial, no ofrecen señal cuando pasa por ellos solamente el gas portados y responden ante alguna propiedad que pueda variar cuando éste se encuentra mezclado con algún analito eluido de la columna ⁴².

La espectrometría de masas (MS) es, probablemente de entre todas las herramientas analíticas al alcance del científico, la de aplicación más general en el sentido de que la técnica es capaz de suministrar información sobre ^{43,44}:

- a) La composición cualitativa y cuantitativa tanto de analitos orgánicos como inorgánicos en muestras complejas.
- b) Las estructuras de una amplia variedad de especies moleculares complejas.
- c) Las relaciones isotópicas de los átomos de las muestras.
- d) La estructura y composición de superficies sólidas.

Los espectrómetros de masas son los detectores utilizados en este proyecto, por tanto, en primer lugar, la espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga. Estos detectores ofrecen una información sobre un compuesto determinado, es decir, su identidad por medio de fragmentos de iones.

Cuando acoplamos un GC con un MS, la técnica cromatográfica nos ofrece mayores posibilidades de separación de compuestos y el acoplamiento de los dos hace que se identifique los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica con mayor seguridad. Esta es la técnica combinada de más amplia utilización ya que reúne una elevada sensibilidad y capacidad de aportar información estructural del espectrómetro ⁴³.

En segundo lugar, las extracciones también pueden ser detectadas con un analizador de triple cuadrupolo (MS/MS) como presenta la Figura 10 ^{45,46}: se trata de una configuración de tres cuadrupolos situados de forma secuencial, de forma que el primero y último (Q1 y Q3) actúan como un cuadrupolos normales, mientras que el segundo tiene unas características especiales y se denomina celda de colisión.

En esta celda se introduce una pequeña cantidad de gas (He, Ar), de forma que los iones que entran, colisionan con los mismos fragmentándose. Los iones formados pasan al Q3 para finalmente ser analizados.

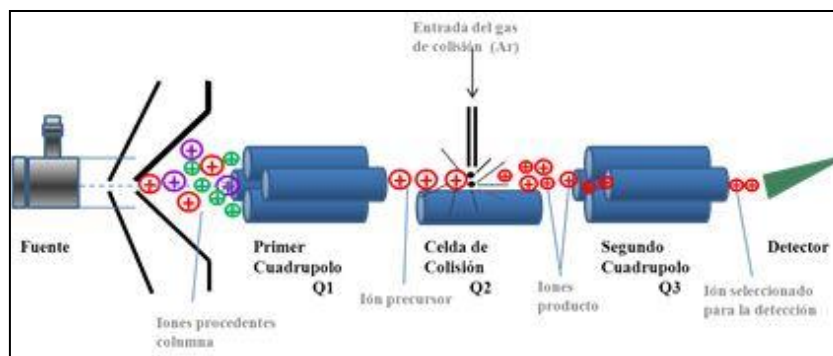


Figura 10 Analizador del triple cuadrupolo

Así, mientras que la celda de colisión no se utiliza como filtro de masas, los cuadrupolos Q1 y Q3 si funcionan como tales y pueden trabajar en modo SIM o SCAN de forma independiente⁴⁶.

La combinación de Q1 y Q3 permite trabajar en cuatro modos diferentes:

- 1) **Neutral Lost Scan (NLS):** los dos cuadrupolos trabajan en modo SCAN. Con este modo se detectan compuestos que en la fragmentación en la celda de colisión se generan una o más moléculas neutras, las cuales se quedan en dicha celda y no pasan al Q3. (Figura 11a)
- 2) **Product Ion Scan:** en el que el Q1 está en modo SIM y el Q3 en modo Scan. Esta modalidad es utilizada principalmente para la puesta a punto de los métodos para la determinación los analitos que nos interesan. (Figura 11b)
- 3) **Precursor Ion Scan (PIS):** en el que el Q1 está en modo SCAN y el Q3 en modo SIM. Con este modo se detectan productos que rinden un mismo fragmento tras su paso por la celda de colisión. (Figura 11c)
- 4) **Multiple Reaction Monitoring (MRM):** los dos cuadrupolos trabajan en modo SIM. Con este modo se detectan de forma específica cada uno de los compuestos que nos interesan eligiendo correctamente el ion en Q1 y en Q3. (Figura 11d)

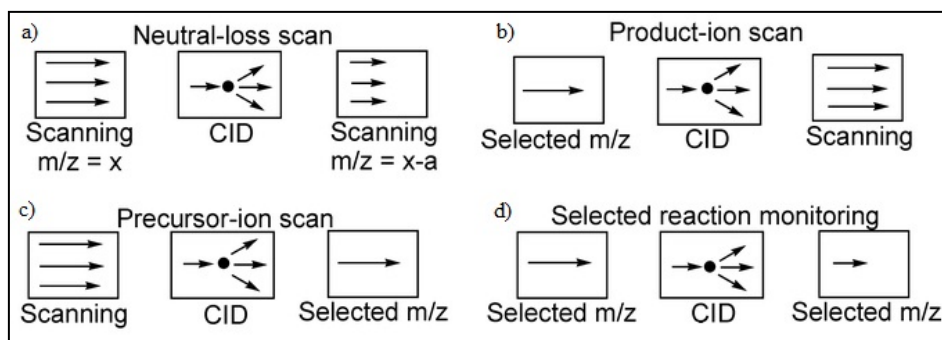


Figura 11 Modos de trabajo de un analizador MS/MS (triple cuadrupolo)

Sistema de registro: Según el manual del equipo de trabajo el software instalado en el equipo de Gerstel es MAESTRO, es el que se encarga de la programación, de las condiciones de análisis, e incluso de la lista de muestras (sample list), este optimiza el

rendimiento y la productividad de todos los módulos y sistemas de GERSTEL, ya que trabaja completamente integrado en el software del GC/MS, también cabe destacar el software MassHunter, este se encarga del tratamiento de datos, integración, confirmación y cuantificación de cada contaminante ⁴⁷.

En este trabajo estudiaremos dos métodos diferentes de análisis con la misma técnica de extracción. Los nombraremos como método 1, al método en que el análisis se realiza mediante GC/MS y método 2 al que se realiza mediante GC-MS/MS.

La mayor diferencia entre los métodos es el detector: En el método 1 determinaremos los compuestos con un espectrómetro de masas con cuadrupolo simple y el método 2, el detector es un acoplamiento MS/MS con triple cuadrupolo.

Los límites de cuantificación no son los mismos, al ser el método 2 mucho más sensible, los límites de cuantificación son también muchos más bajo en este. Por tanto podemos determinar concentraciones menores que en el método 1, todas ellas que cumplan con la legislación. En el caso del R.D 140/2003 para aguas de consumo, está permitido una concentración menor que 0,1 µg/L de cada contaminante.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Patrones y reactivos

Cabe decir, que se utilizará diferentes patrones, unos para el calibrado y otro para los QCs (controles de calidad), la diferencia entre ellos es que uno se prepara para cuantificar la muestra a partir de una ecuación del calibrado, y con el QC verificaremos si se cuantifica correctamente, por tanto, también si hay contaminaciones.

Según el Vocabulario Internacional de Metrología, VIM (2012) por calibración se entiende “el conjunto de operaciones que establecen, en condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento de medida o sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada o por un material de referencia, y los valores correspondientes de esa magnitud realizados por patrones”. Esta definición de calibración es la comúnmente aceptada, pero existe otra según la cual la calibración también se puede considerar como la caracterización de la respuesta de un instrumento en función de las propiedades de un analito. Establece la relación entre una magnitud y la concentración de la sustancia medida ⁴⁸. Se puede hablar por lo tanto de dos tipos de calibración.

Los QCs sirven para evaluar la calidad analítica, que engloba la calidad de los resultados, del proceso analítico y de los materiales y equipos utilizados. Básicamente existen cuatro acciones para el aseguramiento de la calidad analítica: calibración del instrumental a usar, validación del método, verificación de los instrumentos, y realizar controles de calidad, de los resultados ⁴⁹.

PATRONES INTERNOS (Tabla 2): Una sustancia de concentración conocida en la que corrige cuando cuantificamos a través del área de pico a la hora de obtener las concentraciones, además nos indica si se ha producido una contaminación.

Tabla 2 Patrón interno en los dos métodos

Patrones internos	Concentraciones
Disolución mix de todos los patrones como Atracina d5, MBDE-99, Alfa-1,2,3,4,5,6-Hexaclorociclohexano d6, Trifenilfosfato y Perileno d12 en metanol.	500µg/L de los patrones y 2 mg/L Atracina d5

Método 1: GC/MS

DISOLUCIONES ACUOSAS DE CALIBRACIÓN: Estas disoluciones las preparamos diariamente con los patrones de fortificación:

Tabla 3Tabla de las concentraciones de calibrado del método 1

CALIBRADO	
Patrones	Concentración final en ng/L
CAL 1	10 (OCl, OP, HPA's) + 20 (TR)
CAL 2	20 (OCl, OP, HPA's) + 40 (TR)
CAL 3	50 (OCl, OP, HPA's) + 100 (TR)
CAL 4	80 (OCl, OP, HPA's) + 160 (TR)
CAL 5	100 (OCl, OP, HPA's) + 200 (TR)

DISOLUCIÓN ACUOSAS QC: Estas disoluciones las preparamos diariamente con los patrones de fortificación para controlar si el proceso y la cuantificación esta correcta.

Tabla 4Tabla de concentraciones de patrones QC

Patrones	Concentración final en ng/L
QC final	10 (OCl, OP, HPA's) + 20 (TR)

A continuación en la Tabla 5 se explicara en que se compone el calibrado y el QC. Encontraremos patrones individuales de 1000 mg/L, es decir, agrupados por familias, para poder preparar un calibrado con pocos compuestos. Pero la gran mayoría de veces se utiliza un mix de los patrones, una mezcla de todos ellos en distintas concentraciones, que se detallan a continuación, disueltas en Metanol:

Tabla 5 Compuestos con los que se fortificaran el calibrado y el QC

	CALIBRADO	QC
ORGANOCOLORADOS, ORGANOFOSFORADOS, NITROGENADOS E HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	100 µg /L de Organoclorados, Organofosforados, Sectumeton, Terbuconaxol, Nitrogenados, Simacina, Terbutilazina, Terbumeton, HPA's, Epsilon-HCH, amizycle xileno, o,p'-DDE y 200 µg/L de nitrogenados	100 µg /L de Organoclorados, Organofosforados, Sectumeton, Terbuconaxol, Nitrogenados, Simacina, Terbutilazina, Terbumeton, HPA's, Epsilon-HCH, amizycle xileno, o,p'-DDE y 200 µg/L de nitrogenados
BIFENILETERES BROMADOS (BDE's) Y POLICLOROBIFENILOS (PCB's)	100 µg/L de mix de BDE's y PCB's: BDE-99, BDE-100, BDE-47, BDE-28 BDE-153, BDE-154, PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-118, PCB- 138, PCB-153 y PCB-180	100 µg/L de mix de BDE's y PCB's: BDE-99, BDE-100, BDE-47, BDE-28 BDE-153, BDE-154, PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-118, PCB- 138, PCB-153 y PCB-180
PATRONES NO ACREDITADOS	100 µg/L de Cipronazol, Fenbuconazol, Metil Cresoxim, Piriproxifen, Piridaben y Cipermetrina y 200 µg/L de propazina	

Método 2: GC-MS/MS

DISOLUCIONES ACUOSAS DE CALIBRACIÓN preparadas a diario:

Tabla 6 Cantidades a añadir para preparar calibrado diario

Patrones	Vol (µl)	Vol (µl)	Vol (µl)	Vol (µl)	Vol (µl)	Vol (µl)
	Patrón 1 (CAL) (comp. Semivol.)	Patrón 3 (CAL) (Cloroalc. C10-C13)	Patrón 4 (Toxafeno)	Patrón 5 (HPA's no acred.)	Patrón 6 (Clordecon)	Patrón 7 (PCB's no acred.)
CAL 1	10	20	20	10	10	10
CAL 2	20	40	40	20	20	20
CAL 3	50	80	80	50	50	50
CAL 4	100	100	100	100	100	100
CAL 5	200	-	-	200	200	200

DISOLUCIÓN ACUOSAS QC preparadas día a día:

Tabla 7 cantidades a añadir para prepara el patrón Qc a diario

Patrones	Vol (μl)	Vol (μl)	Vol (μl)	Vol (μl)	Vol (μl)	Vol (μl)
	Patrón 2 (QC) (comp. Semivol.)	Patrón 3 (QC) (Cloroalc. C10-C13)	Patrón 4 (Toxafeno)	Patrón 5 (HPA's no acred.)	Patrón 6 (Clordecon)	Patrón 7 (PCB's no acred.)
CAL 1	10	20	20	10	10	10

La Tabla 8 resume las concentraciones de cada contaminante en los patrones de calibración y QC:

Tabla 8 Concentraciones de los compuestos con los que se foritfican , tanto el calibrado como el Qc

	CALIBRADO	QC
ORGANOCOLORADOS, ORGANOFOSFORADOS, NITROGENADOS, BDE, PCB E HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	5 μg/L OCl, PCB's, HPA's, 50 μg/L OP, 100 μg/L de Nitrogenados y Naftaleno y 2 μg/L de BDE's.	mix de 5 μg/l de organoclorados, 50 μg/l de organofosforados, 100 μg/l de Nitrogenados y Naftaleno, 2 μg/l de BDE's, 5 μg/l de PCB's, 5 μg/l de HPA's,
PATRONES NO ACREDITADOS	- 15μg/L de PCB's, PCB- 105 y PCB-156 - 5000 μg/L de disolución Clordecon. - 1 mg/L de Toxafeno	100μg/L de Hexabromobifenil y 500 μg/L de hexabromociclododecano en metanol

3.2. Procedimiento experimental.

3.2.1. Método 1

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS SEMIVOLÁTILES CON SBSE POR GC-MS:

El procedimiento que se lleva a cabo es el siguiente:

Para el calibrado y QC:

- En un matraz erlenmeyer introducir 100 ml de agua mineral medidos con probeta y añadir 27 g de NaCl. Tapar y agitar hasta completa disolución del cloruro sódico. Adicionar una punta de espátula de tiosulfato sódico y agitar.
- Adicionar 10 μL de patrón interno, del mix de patrones descritos en el apartado anterior, para conseguir 50 ng/L de todos los patrones

internos a excepción de la Atracina d5 que estará a una concentración de 200 ng/L.

- c) Añadir el volumen de patrón correspondiente a cada uno de los erlenmeyers para conseguir las diferentes concentraciones correspondientes a los patrones de calibración y QC.
- d) Tenemos que conseguir que tanto las muestras como el calibrado tenga la misma cantidad de metanol, por lo tanto le adicionaremos hasta 100 μ L a cada uno, es decir la diferencia entre 100 μ L y la cantidad de patrón.
- e) Se introduce el twister a cada uno de los matraces, estos twisters tienen que estar bien anotados en las libretas de registro, anotar también la fecha del uso de cada twister en la libreta (*ya sabemos que tienen ciertos usos*).
- f) Agitar durante 12 horas en agitador magnético.
- g) Extraer el twister (ya con los analitos adsorbidos), tener en cuenta que al estar agitando con sal tenemos que lavarlo con agua MiliQ para evitar dañar la columna, secar e introducir en el *liner*.
- h) Análisis en el cromatógrafo

Para las muestras:

- a) En un matraz 100 ml de muestra.
- b) Se le añade 27g de NaCl calcinada a todos los matraces y se agita, esto es para cambiar la fuerza iónica y observar mucho mejor el resultado. La calcinamos para evitar que el twister absorba compuestos orgánicos que aparecen a T_R muy próximos al analito, así evitar interferencias.
- c) Añadimos tiosulfato sódico a todos los matraces ya que las aguas potables llevan cloro y con el tiosulfato hacemos que este no interfiera en el análisis.
- d) Añadimos patrón interno como en el calibrado y QC.
- e) Se añaden 100 μ L de metanol.
- f) Se introduce el twister a cada uno de los matraces, estos twisters tienen que estar bien anotados en las libretas de registro, anotar también la fecha del uso de cada twister en la libreta (*ya sabemos que tienen ciertos usos*).
- g) Agitar durante 12 horas en agitador magnético.
- h) Extraer el twister (ya con los analitos adsorbidos), tener en cuenta que al estar agitando con sal tenemos que lavarlo con agua MiliQ para evitar dañar la columna, secar e introducir en el *liner*.
- i) Escribir la “Sample list”, es decir programar las inyecciones en el equipo.
- j) Análisis en el cromatógrafo.

Cabe decir que el patrón interno es el que nos corrige todas las desviaciones que podamos tener en la extracción.

Tenemos que tener en cuenta que el material utilizado en la realización de este análisis debe ser de vidrio ya que así se evitarán posibles contaminaciones por ftalatos.

Los twisters utilizados para realizar las extracciones de los tres patrones más concentrados de la calibración o de muestras muy contaminadas, se tendrán que someter a una segunda desorción de limpieza para eliminar los contaminantes orgánicos que no se hayan podido desprender del twister en la primera desorción y así evitar la contaminación cruzada con la siguiente muestra.

El NaCl usado en la preparación de muestras, se calcina a 300°C durante 10 horas antes de su uso para evitar que en el proceso de extracción, el twister absorba compuestos orgánicos provenientes de la sal que aparecen a tiempos de retención muy próximos al de los compuestos que se analizan por este método y por tanto que dichos compuestos aparezcan interferidos.

Una interferencia común en este análisis es la aportada por la propia matriz de la muestra analizada, la cual puede presentar sólidos suspendidos, turbidez, materia orgánica... impidiendo realizar la extracción con el volumen de muestra adecuado. En estos casos se realiza el análisis con menos volumen de muestra y por tanto, se subirán los límites de cuantificación de cada parámetro proporcionalmente.

- EQUIPOS UTILIZADOS:

- Twister GERSTEL 2 cm 0.5mm espesor de fase.
- Agitador magnético multiposición con velocidad regulable (GERSTEL Multistirrer).
- Microjeringas
- Pipeta automática
- Espectrómetro de Masa Agilent 5975i o 5975C con conexión a Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N o 7890A equipado con columna SAPIEN.5MS de 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm ó Zebron ZB-5MS de 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, e Inyector PTV (CIS-4+) Gerstel refrigerado por Peltier
- Inyector multipropósito MPS2 GERSTEL.
- Sistema de Desorción Térmica GERSTEL TDU.
- Balanza analítica con resolución mínima 0.0001g calibrada.
- Granatario con resolución 0.01g calibrado Congelador.
- Nevera
- Mufla

- **CONDICIONES PARA LA DETERMINACIÓN INSTRUMENTAL DEL MÉTODO 1:**

COLUMNA: ZB-5MS, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm

- a) Mode: Constant Pressure.
Método RTL a presión constante
(Método bloqueado con Metil-
Clorpirifos a 16.59 min (Ión
286)).
- b) Inlet: Back
- c) Detector: MSD
- d) Runtime: 41.87 min

HORNO:

- a) Oven: ON
- b) Setpoint: 70 °C
- c) Maximum Temp: 325 °C

INYECTOR:

- a) Back Inlet
- b) Mode: PTV Solvent Vent
- c) Pressure: La elegida por el
método al bloquear RTL.
- d) Vent time: 0.00min
- e) Vent flow: 50ml/min
- f) Vent Pressure: Algo superior a
la de trabajo (0.1psi por encima)
- g) Purge flow to split vent: 50.0
ml/min.
- h) Purge Time: 2 min
- i) Total Flow: El que el sistema
calcule automáticamente.
- j) Gas saver: Off.

AUXILIAR:

- a) Temperatura línea de
transferencia: Heater: ON
- b) Setpoint: 280 °C

PARÁMETROS DE GERSTEL:

TDU:

- a) Sample mode: Sample Remove
- b) Desorption mode: Splitless

TRANSFER TEMP: 300°C

- a) Initial Temp: 40°C
- b) Initial Time: 0 min
- c) Delay Time: 0.50 min
- d) 1st rate: 60°C/min
- e) 1st Final Temp: 290°C
- f) 1st Final Time: 15.00 min

CIS4:

- a) Initial Temp: 30°C
- b) Equilib. Time: 0.10 min
- c) Initial Time: 0min
- d) 1st rate: 10°C/seg
- e) 1st Final Temp: 325°C
- f) 1st Final Time: 7.00 min
- g) Cryo-cooling: ON

ESPECTRÓMETRO DE MASAS:

- a) EM Voltage: +200
- b) Solvent Delay: 3.20 min
- c) Acquire Scan and SIM data
- d) Zones:
 - a. T Source: 230 °C
 - b. T. Quad: 150 °C

EDIT SIM PARAMETERS:

1-. Terbutilazina (Tabla 9)

- a) Resolution: Low
- b) Start Time: 12.65
- c) Cycles/ Sec: 2.82
- d) Edit ion:

La tabla 9 muestra la relación masa carga de cada uno de los iones.

Tabla 9 Relación masa/carga de los iones de la Terbutilacina

m / z	Compuesto	Dwell	Plot
173	Terbutilacina	9	
214	Terbutilacina	9	
229	Terbutilacina	9	

2-. Metolaclor (Tabla 10)

- a) Resolution: Low
- b) Start Time: 17.85
- c) Cycles/ Sec: 3.20
- d) Edit ion:

La Tabla 10 muestra la relación masa carga de los iones de metolaclor, para poder identificarlos correctamente.

Tabla 10 Relación masa/carga de los iones Metolaclor

m / z	Compuesto	Dwell	Plot
162	Metolaclor	10	
238	Metolaclor	10	

Según la teoría, el tiempo de retención aproximado, el ión Target (ión de cuantificación), y cualificadores (Q1,Q2,Q3), con esto podemos identificar de manera inequívoca cada uno de los compuestos, comparando el tiempo de retención y el solapamiento de los picos de la muestra con los iones cualificadores.

Tabla 11 Relación masa/carga de los iones target y los cualificadores, además del tiempo de retención de cada compuesto

Compuesto	tr (min) ZB-5MS	Target (m/z)	Q1 (m/z)	Q2 (m/z)	Q3 (m/z)
Metolaclor	18,89	162	238		
Terbutilacina	14,06	173	214	229	

3.2.2. Método 2

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS SEMIVOLÁTILES CON SBSE POR GC-MS/MS:

El procedimiento que se lleva a cabo es el siguiente:

Para el calibrado y QC:

- a) En un matraz erlenmeyer introducir 100 ml de agua mineral medidos con probeta. Adicionar una punta de espátula de tiosulfato sódico y agitar.
- b) Adicionar 10 µL de patrón interno, del mix de patrones descritos en el apartado anterior, para conseguir 50 ng/L de todos los patrones internos a excepción de la Atracina d5 que estará a una concentración de 200 ng/L.
- c) Añadir el volumen de patrón correspondiente a cada uno de los erlenmeyers para conseguir las diferentes concentraciones correspondientes a los patrones de calibración y QC.
- d) Tenemos que conseguir que tanto las muestras como el calibrado tenga la misma cantidad de metanol, por lo tanto le adicionaremos hasta 1 mL a cada uno, es decir la diferencia entre 1 mL y la cantidad de patrón.
- e) Se introduce el twister a cada uno de los matraces, estos twisters tienen que estar bien anotados en las libretas de registro, anotar también la fecha del uso de cada twister en la libreta (*ya sabemos que tienen ciertos usos*).
- f) Agitar durante 24 horas en agitador magnético.
- g) Extraer el twister (ya con los analitos adsorbidos), tener en cuenta que al estar agitando con sal tenemos que lavarlo con agua MiliQ para evitar dañar la columna, secar e introducir en el *liner*.
- h) Análisis en el cromatógrafo

Para las muestras:

- a) En un matraz 100 ml de muestra.
- b) Añadimos tiosulfato sódico a todos los matraces ya que las aguas potables llevan cloro y con el tiosulfato hacemos que este no interfiera en el análisis.
- c) Añadimos patrón interno como en el calibrado y QC.
- d) Se añaden 100 µL de metanol.
- e) Se introduce el twister a cada uno de los matraces, estos twisters tienen que estar bien anotados en las libretas de registro, anotar

también la fecha del uso de cada twister en la libreta (*ya sabemos que tienen ciertos usos*).

- f) Agitar durante 24 horas en agitador magnético.
- g) Extraer el twister (ya con los analitos adsorbidos), tener en cuenta que al estar agitando con sal tenemos que lavarlo con agua MiliQ para evitar dañar la columna, secar e introducir en el liner.
- h) Escribir la “Sample list”, es decir programar las inyecciones en el equipo.
- i) Análisis en el cromatógrafo

A tener en cuenta que el material utilizado en la realización de este análisis debe ser de vidrio ya que así se evitarán posibles contaminaciones por ftalatos.

Los twisters utilizados para realizar extracciones de patrones muy concentrados o de muestras muy contaminadas, se tendrán que someter a una segunda desorción de limpieza para eliminar los contaminantes orgánicos que no se hayan podido desprender del twister en la primera desorción y así evitar la contaminación cruzada con la siguiente muestra.

Una interferencia común en este análisis es la aportada por la propia matriz de la muestra analizada, la cual puede presentar sólidos suspendidos, turbidez, materia orgánica... impidiendo realizar la extracción con el volumen de muestra adecuado. En estos casos se realiza el análisis con menos volumen de muestra y por tanto, se subirán los límites de cuantificación de cada parámetro proporcionalmente.

- EQUIPOS UTILIZADOS

- Twister GERSTEL 2 cm 0.5mm espesor de fase, verificados.
- Agitador magnético multiposición con velocidad regulable.
- Microjeringas.
- Pipeta automática.
- Espectrómetro de Masas Triple Quadrupolo Agilent 7000^a con conexión a Cromatógrafo de Gases Agilent 7890^a equipado con columna HP-5MS de 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm ó similar, e Inyector PTV (CIS-4+) Gerstel refrigerado por Peltier.
- Inyector multipropósito MPS2 GERSTEL.
- Sistema de Desorción Térmica GERSTEL TDU.
- Balanza analítica con resolución mínima 0.0001g calibrada y verificada.
- Congelador.
- Nevera.

- **CONDICIONES PARA LA DETERMINACIÓN INSTRUMENTAL DEL MÉTODO 2:**

COLUMNA: Agilent 19091S-433: 325

°C:30 m x 0.25 mm x 0.25 µm

- a) Mode: Pressure : 3psi
- b) Inlet: Back PTU Inlet He.
- c) Detector: MSD
- d) Runtime: 17,50 min

HORNO:

- a) Oven: ON
- b) Setpoint: 70 °C
- c) Maximum Temp: 325 °C

INYECTOR:

- a) Back Inlet
- b) Mode: PTV Solvent Flow
- c) Pressure: La elegida por el método al bloquear RTL.
- d) Vent time: 0.00min
- e) Vent flow: 50ml/min
- f) Vent Pressure: Algo superior a la de trabajo (0.1psi por encima)
- g) Purge flow to split vent: 50.0 ml/min.
- h) Purge Time: 2 min
- i) Total Flow: El que el sistema calcule automáticamente.
- j) Gas saver: 20 mL/min.

AUXILIAR:

- a) Temperatura línea de transferencia: Heater: ON
- b) Setpoint: 280 °C

CELDA DE COLISIÓN:

- a) He Quench gas: 2,5 mL/min
- b) N₂ Collision gas: 1,5 mL/min

PARÁMETROS DE GERSTEL:

TDU:

- c) Sample mode: Sample Remove
- d) Desorption mode: Splitless

TRANSFER TEMP: 300°C

- g) Initial Temp: 40°C
- h) Initial Time: 0 min
- i) Delay Time: 0.50 min
- j) 1st rate: 60°C/min
- k) 1st Final Temp: 290°C
- l) 1st Final Time: 15.00 min

CIS4:

- h) Initial Temp: 30°C
- i) Equilib.Time: 0.10 min
- j) Initial Time: 0min
- k) 1st rate: 10°C/seg
- l) 1st Final Temp: 325°C
- m) 1st Final Time: 7.00 min
- n) Cryo-cooling: ON

ESPECTRÓMETRO DE MASAS:

- e) EM Voltage: +200
- f) Solvent Delay: 3.20 min
- g) Acquire SIM and SIM data
- h) Zones:
 - a. T Source: 250 °C
 - b. T. Quad: 150 °C

El tiempo de retención aproximado y las transiciones para cada uno de los compuestos son los siguientes, ya que otra de las diferencias que es el método determinamos compuestos por medio de transiciones, es decir un ion en concreto:

Tabla 12 Transiciones de Terbutilacina y Metolaclor

Compuesto	tr Columna Zebron(min)	Transición Cuantificación (m/z)	Transición Cualificación (m/z)	Transición Cualificación (m/z)
Terbutilacina	8.11	229→173	214→104 173→138 (Fast)	214→132 214→136 (Fast)
Metolaclor	9.20	162→133	238→162	238→133

4. RESULTADOS

En nuestro trabajo, analizaremos dos muestras por un método y otra por el 2, en la que identificaremos y cuantificaremos compuestos como la Terbutilazina, un herbicida organonitrogenado y el Metolaclor, un herbicida organoclorado.

1) Método 1:

Las dos muestras presentaban un aspecto transparente y translúcido, por tanto la extracción se realiza con 100 mL que es lo descrito en el procedimiento. Es una matriz de agua potable. Por lo tanto debe cumplir con el R.D 140/2003.

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, los patrones de fortificación para el calibrado y QC, es el mix de los compuestos acreditados, y el patrón interno el mix de P.I (Tablas 2 y 5).

Los resultados de la primera muestra por este método muestra son:

De forma cualitativa, podemos comparar un punto del calibrado, en este caso el más alto, para observar que el tiempo de retención de los dos, tanto de la muestra como el del calibrado, sea el mismo. Además de que con los cualificadores en el mismo tiempo de retención e igual forma de pico y que los ratios se encuentren alrededor de 100% podemos confirmar que es exactamente ese compuesto.

Terbutilazina:

Calibrado: Escogimos el Cal 5 para identificar el compuesto.

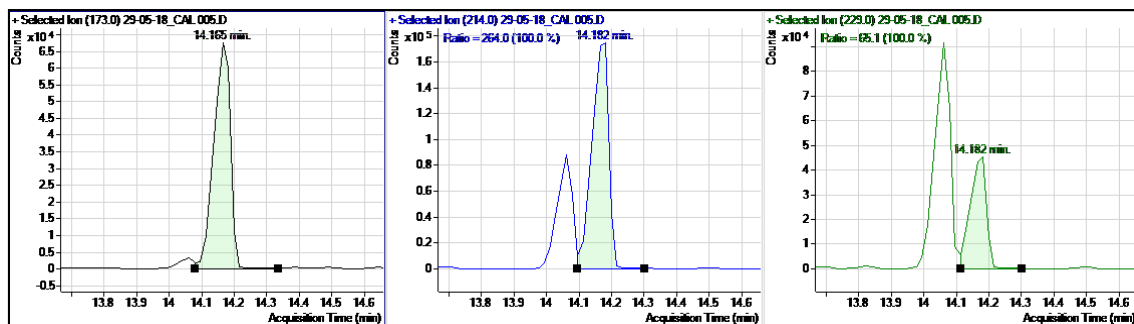


Figura 12 Ion target del calibrado 5, así como los cualificadores

El tiempo de retención es 14,165, tanto en el ion Target como en los cualificadores, así como en la muestra en que las formas de piso son idénticas y se pueden solapar:

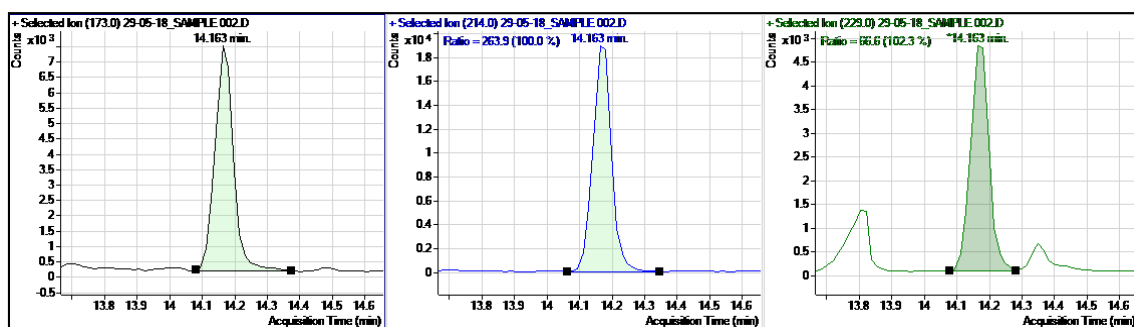


Figura 13 Ion target y cualificadores de la muestra para la Terbutilazina

Por lo que podemos decir que es el mismo compuesto, la misma forma de pico, mismo tiempo de retención y mismos iones cualificadores, tanto la muestra como el calibrado, cerca de un 100% de ratio.

Los resultados de la segunda muestra por este método muestra son:

De forma cualitativa, podemos comparar un punto del calibrado, en este caso el más alto, para observar que el tiempo de retención de los dos, tanto de la muestra como el del calibrado, sea el mismo. Además de que con los cualificadores en el mismo tiempo

de retención e igual forma de pico y que los ratios se encuentren alrededor de 100% podemos confirmar que es exactamente ese compuesto.

Metolaclor:

Calibrado: Escogimos el Cal 5 para identificar el compuesto.

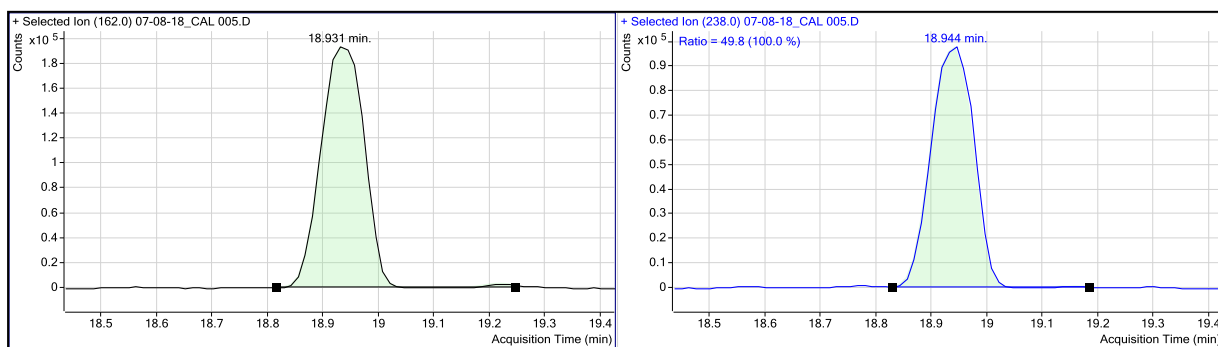


Figura 15 Ion target del calibrado de Metolaclor y su ion cualificador

Muestra:

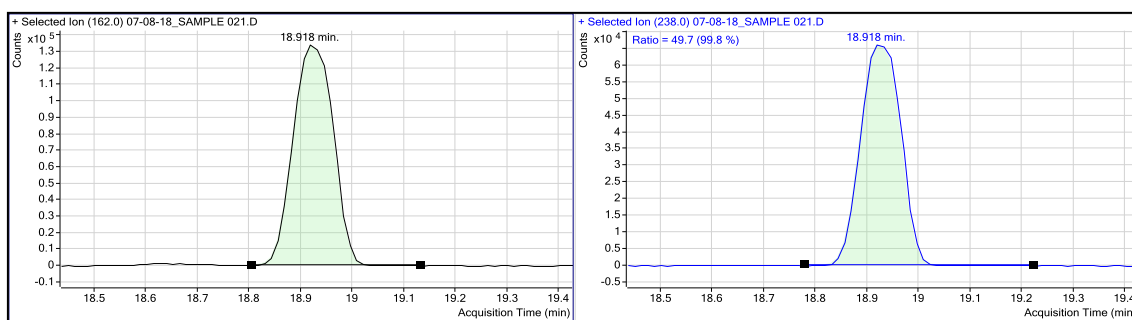


Figura 16 Ion target de la muestra comparado con su cualificador

Es exactamente como el caso del otro compuesto, tanto el calibrado como la muestra coinciden en tiempo de retención, forma de pico e iones cualificadores.

En cuanto a la cuantificación con fortificación de los patrones de la Tabla 5 a distintas concentraciones obtenemos la información del Masshunter (software para cuantificar):

Tabla 13 Datos del MassHunter para calculo de concentración en las muestras

Muestra 1			Muestra 2		
Calibrado Terbutilazina			Calibrado Metolaclor		
Concentración (ng/L)	Área	PI	Concentración (ng/L)	Área	PI
22,10	25460	258837	10,14	101694	107419
40,48	50253	267071	21,76	201251	89350
101,42	124118	255504	53,76	540854	84896
167,02	192146	238329	79,25	829325	81310
214,97	235664	226507	107,03	1061915	71150

$y = Ax + B$		$y = Ax^2 + Bx + C$	
$y = 0.004884x - 0.009572$		$y = 3,736139E-4x^2 + 0,100493x - 0,111155$	

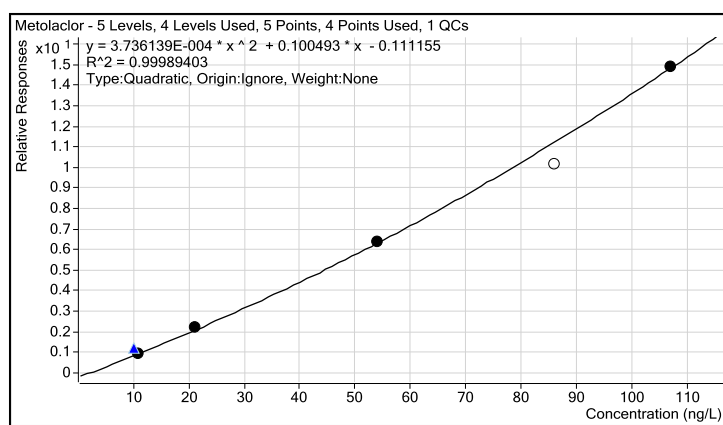
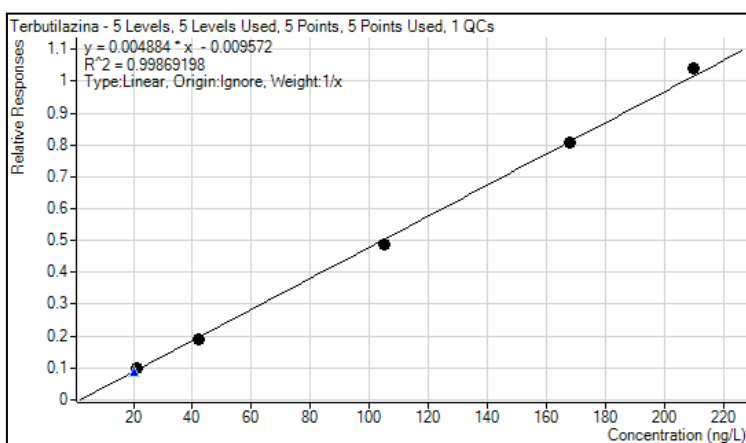


Figura 16 Arriba, calibrado de Terbutilazina. Abajo, calibrado del Metolaclor.

El QC cumple con lo descrito (tabla 14), ya que se prepara igual que el calibrado más bajo, y cumple que no ha habido contaminación durante el proceso.

Tabla 14 Comparación de QC con el calibrado, donde se observa que el proceso de selección es el correcto.

MUESTRA 1			MUESTRA 2		
QC Terbutilazina			QC Metolaclor		
Concentración (ng/L)	área	PI	Concentración (ng/L)	área	PI
20,46	26009	287872	11,32	81768	76095
CAL 1 Terbutilazina			CAL 1 Metolaclor		
Concentración (ng/L)	área	PI	Concentración (ng/L)	área	PI
22,10	25460	258837	10,14	101694	107419

En cuanto a la Terbutilazina el calibrado presenta una recta lineal, en la que se interpolará el área de la muestra para obtener su concentración. El calibrado del Metolaclor, se adapta mejor a una recta cuadrática, en la que realizaremos lo mismo para calcular la concentración.

El estudio de linealidad se realizó a la hora de la puesta a punto del método por tanto no se realizó ningún estudio durante mi estancia en la empresa.

Tabla 15 Resultado de la cuantificación

MUESTRA 1			MUESTRA 2		
Terbutilazina			Metolaclor		
Concentración (ng/L)	area	PI	Concentración (ng/L)	area	PI
24,69	28259	254581	88,03	723594,25	62214

En nuestras muestras (Tabla 15) hay **24,69 ng/L de Terbutilazina en la muestra 1** y **88,03 ng/L de Metolaclor en la muestra 2** con el mismo método de extracción y análisis. Muestras positivas en los dos compuestos ya que se encuentra por encima del límite de cuantificación y decir también que cumple con la legislación del R.D 140/2003.

Método 2:

La muestra presentaba un aspecto transparente y translúcido, por tanto la extracción se realiza con 100 mL que es lo descrito en el procedimiento. Es una matriz de agua potable. Por lo tanto debe cumplir con el R.D 140/2003.

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, los patrones de fortificación para el calibrado y QC, es el mix de los compuestos acreditados, y el patrón interno el mix de P.I.

Los resultados de la tercera muestra son:

En este caso tendremos el tiempo de retención para comparar e identificar y en lugar de los iones cualificadores, son las transiciones (iones precursores e iones producto) las que nos confirmarán la identificación de compuestos. Se observa que tienen igual forma de pico y un ratio aprox. 100%. De forma cuantitativa es el mismo procedimiento.

Terbutilazina:

Calibrado: Escogimos el Cal 5 para identificar el compuesto.

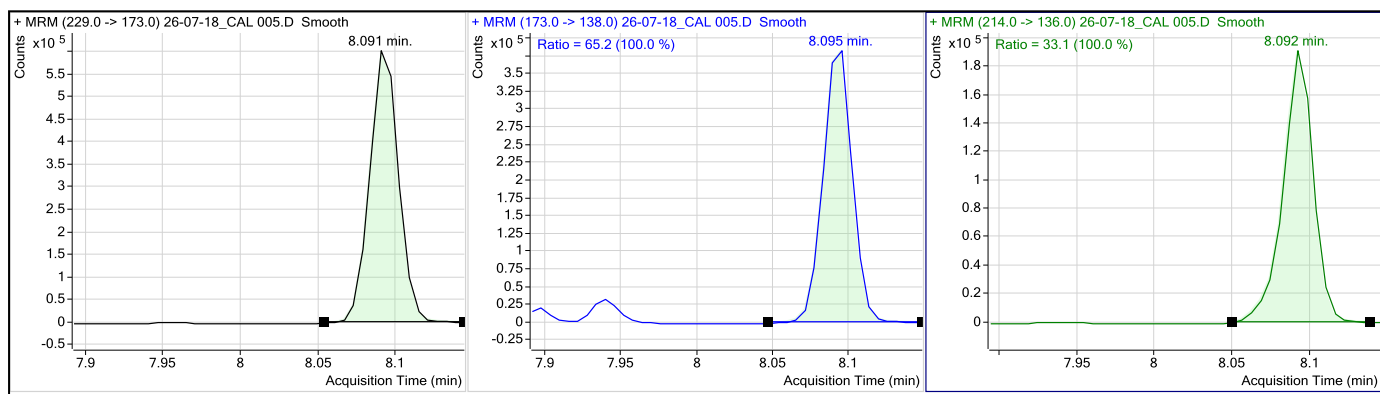


Figura 17 Calibrado del ion precursor y sus transiciones

El tiempo de retención es 8,1, tanto en el ion precursor como en las transiciones de este compuesto, descritas en la Tabla 12.

La muestra (Figura 18) nos indica que el tiempo de retención es el mismo que el calibrado.

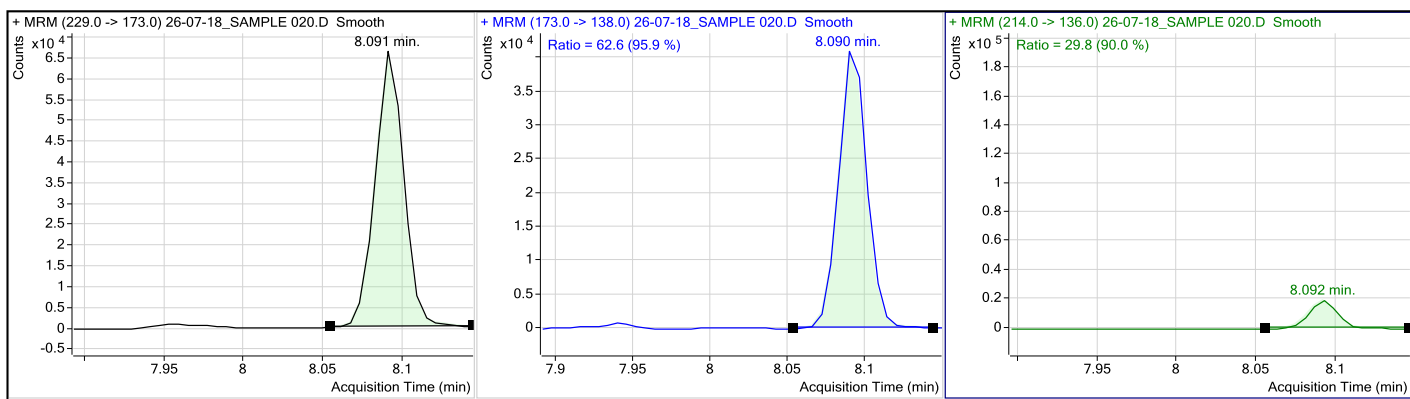


Figura 18: Ión precursor de la muestras y sus transiciones

Por lo que podemos decir que es el mismo compuesto, es el mismo tiempo de retención en todas las transiciones mostradas.

Metolaclor:

Calibrado: Escogimos el Cal 5 para identificar el compuesto.

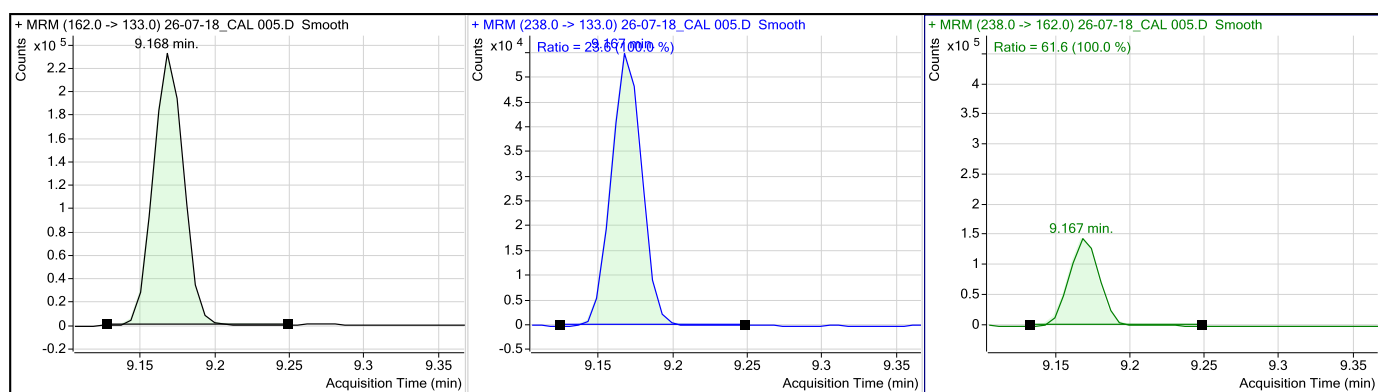


Figura 19 Ion precursor y transiciones del calibrado de Metolaclor

Lo mismo que el otro compuesto, coinciden el tiempo de retención y sus transiciones.

Muestra:

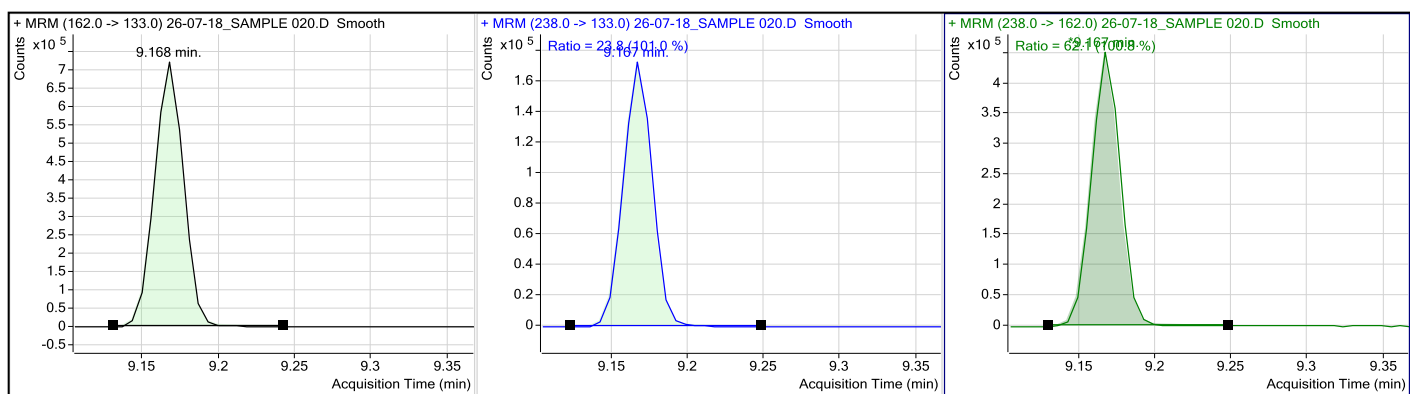


Figura 20: Ion precursor y transiciones de Metolaclor en la muestra

Es exactamente como el caso del otro compuesto, tanto el calibrado como la muestra coinciden en tiempo de retención.

En cuanto a la cuantificación con fortificación de los patrones de la Tabla 8 a diferentes concentraciones, obtenemos la información del Masshunter (software para cuantificar):

Tabla 16 Datos del MassHunter para el cálculo de la concentración de la muestra

Calibrado Terbutilazina			Calibrado Metolaclor		
Concentración (ng/L)	Área	PI	Concentración (ng/L)	Área	PI
12,23	59737	704087	0,58	22945,49	256311
25,67	107350	695485	1,06	47493,39	233882
62,79	241013	708833	2,46	95935,91	180669
113,91	396326	685986	4,68	156502,10	148878
253,01	796397	695986	10,90	333233,83	132757

$y = Ax^2 + Bx + C$		$y = Ax + B$	
$y = -3.398697E-006x^2 - 0.005301x + 0.020518$		$y = 0,234491x - 0,046502$	

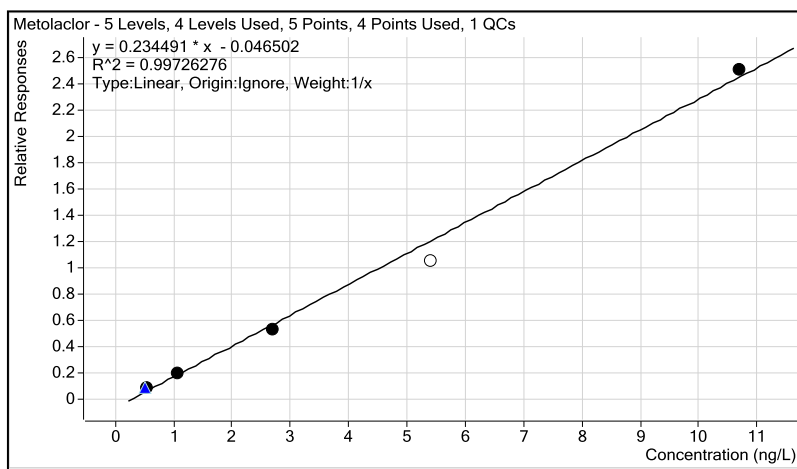
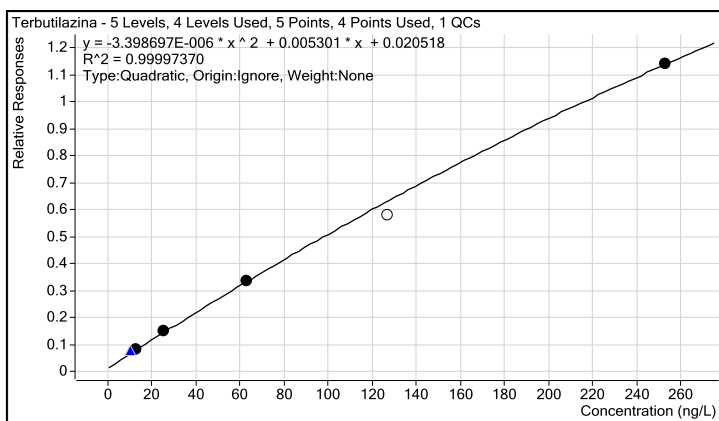


Figura 21 Arriba, la recta de calibración de la Terbutilazina y abajo, la recta del Metolaclor

El QC cumple con lo descrito (Tabla 17), ya que se prepara igual que el calibrado más bajo, y cumple que no ha habido contaminación durante el proceso.

Tabla 17 Comparación Qc y Cal para descartar fallo o contaminación en el proceso de extracción

QC Terbutilazina			QC Metolaclor		
Concentración (ng/L)	Área	PI	Concentración (ng/L)	Área	PI
10,97	47449	606181	0,57	21543	244703
CAL 1 Terbutilazina			CAL 1 Metolaclor		
Concentración (ng/L)	Área	PI	Concentración (ng/L)	Área	PI
12,23	59737	704087	0,58	22945	256311

En cuanto a la Terbutilazina el calibrado presenta una recta cuadrática, en la que se interpolará el área de la muestra para saber su concentración. Y el metolaclor, se adapta mejor a una recta lineal, en la que realizaremos lo mismo para saber la concentración.

El estudio de linealidad se realizó a la hora de la puesta a punto del método por tanto no se realizó ningún estudio en la empresa durante mi estancia.

Tabla 18 Resultados de la cuantificación del método 2

Muestra terbutilazina			Muestra Metolaclor		
Concentración (ng/L)	Área	PI	Concentración (ng/L)	Área	PI
17,03	83221	75769	27,77	966778	149515

En nuestra muestra (tabla 18) hay **17,03 ng/L de Terbutilazina y 27,77 ng/L de Metolaclor**. Muestra positiva en los dos compuestos, ya que supera el límite de cuantificación y cumple con lo permitido del R.D 140/2003. Y se puede observar que podemos detectar a un nivel más bajo de cuantificación con este método.

5. CONCLUSIÓN

De las dos muestras (una por cada método) podemos decir que entre los dos métodos la diferencia es el límite de cuantificación. El método dos puede detectar menor concentración que el 1.

Los límites de cuantificación de los métodos desarrollados se presentan en la Tabla 19:

Tabla 19 Límites de cuantificación de cada uno de los métodos y compuestos

LOQ (ng/L)	Método 1	Método 2
Terbutilacina	20	10
Metolaclor	20	0,5

Mediante estos métodos, con procesos de extracción sencillos y tiempos de análisis cortos, podemos identificar y cuantificar una gran cantidad de plaguicidas, con LOQ bajos según la legislación en vigor, R.D 140/2003, que nos indica la cantidad permitida de cada compuesto en el caso de matrices como las aguas potables.

Cabe decir también que estos métodos son específicos, exactos y precisos para identificar cualquier compuesto citado en la introducción.

Además de estos métodos, en mi estancia en prácticas en Iproma, he aprendido muchos más métodos a la vez de colaborar con el equipo humano del que se compone en el trabajo del día a día.

6. AGRADECIMIENTOS

A mi padre por el apoyo incondicional todos estos días, y a mi madre que desde donde esté me ha enviado toda la fuerza y la valentía que necesitaba.

Dar gracias también a todos mis compañeros por la paciencia que han tenido conmigo todo este tiempo, y por el interés en enseñarme todo lo que he aprendido que no es poco, he estado muy a gusto tanto a nivel personal como profesional.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1) <http://www.iproma.com/es/la-empresa>
- 2) Damià Barceló* L y López de Alda MJ. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC (Barcelona) 2001
- 3) Oyarzún, P., Gallegos, P., Asaquibay, C., Forbes, G., Ochoa, J., Paucar, B., Prado, M., Revelo, J., Sherwood, S. y Yumisaca, F. 2002. Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades. In: El cultivo de la papa en el Ecuador. Pumisacho, M. y Sherwood, S. (eds). Quito. INIAP, CIP. pp. 85-169.
- 4) Yanggen, D., Crissman, C., y Espinosa, P. (eds). 2003. Los plaguicidas: Impactos en la producción salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador. CIP, INIAP. 199 p.
- 5) Orozco, F.A., Cole, D.C., Forbes, G., Kroschel, J., Wanigaratne, S., and Arica, D. 2009. Monitoring adherence to the International Code of Conduct: Highly hazardous pesticides in central Andean agriculture and farmers' rights to health. *Int J Occup Environ Health* 15:255–268.
- 6) Weselak M, Arbuckle T, Foster W. Pesticide Exposures and Developmental Outcomes: The Epidemiological Evidence. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B.* 2007;10:41-80.
- 7) Vale J A. Toxicokinetic and Toxicodynamic Aspects of Organophosphorous Insecticide Poisoning. *Toxicology Letters.* 1998;102:649-52.
- 8) Brouwer A, Ahlborgh UG, Van den Berg M, Birnbaum LS, Ruud BE, Bosveld B, Denison MS, Earl GL, Hagmarg L, Holeneh E, Huisman M, Jacobson SW, Jacobson JL, Koopman-Esseboom C, Koppeke JG, Kulig BM, Morsea DS, Mucklem G, Peterson RE, Sauer PJ, Seegal RF, Smits-Van PAE, Touwen BCL, Weisglas-Kuperus N, Winneker G. Functional aspects of developmental toxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in experimental animals and human infants. *Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmacol.* 1995; 293(1):1-40.
- 9) Gyalpo T, Fritsche L, Bouwman H, Bornman R, Scheringer M, Hungerbühler K. Estimation of human body concentrations of DDT from indoor residual spraying for malaria control. *Environ Pollut.* 2012; 169:235-241.
- 10) Den Hond E y Schoeters G. Endocrine disruptors and human puberty. *Intern J Andrology.* 2006; 29: 264-271.
- 11) Hayes, W. J. *Toxicology of Pesticides.* Baltimore, Williams and Wilkins Co., 1974.
- 12) Nilda A.G.G. de Fernícola. Toxicología de los insecticidas organoclorados. *Bol OfSanit Panam* 98(1),1985
- 13) Escobichon DJ. Toxic effects of pesticides. Casarett & Doull's *Toxicology. The basic science of poisons.* CD Klaasen (ed), McCraw-Hill, New York, 1996, pp. 643-689.
- 14) Hayes WJ Jr, Lows ER Jr. *Handbook of pesticides toxicology.* Vol 1,2 and 3. Academic Press. New York, 1991.

- 15) Black KK, Carlisle J, Siegel D, Salinas J. Health concerns and environmental issue with PVC-containing building materials in green buildings integrated waste management board. USA: California Environmental Protection Agency; 2006; p. 11.
- 16) Miller-Pérez C, Sánchez-Islas E, Mucio-Ramírez S, Mendoza-Sotelo J, León-Olea M. Los contaminantes ambientales bifenilos policlorinados (PCB) y sus efectos sobre el Sistema Nervioso y la salud. *Salud Mental* 2009;32:335-346.
- 17) Breivik K, Sweetman A, Pacyna JM, Jones KC. <<Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners a mass balance approach 1. Global production and consumption>>. *Science Total Environment* 2002;290:181-198.
- 18) Safe S, Safe L, Mullin M. Polychlorinated biphenyls: environmental occurrence and analysis. En: *Polychlorinated biphenyls (PCBs): Mammalian and environmental toxicology*. Safe S, Hutzinger O (eds.). Berlin: Springer-Verlag; 1987; 1-13.
- 19) Stewart P, Reihman J, Lonky E, Darvill T, Pagano J. Prenatal PCB exposure and neonatal behavioral assessment scale (NBAS) performance. *Neurotoxicol Teratol* 2000;22:21-29.
- 20) Rocha-Gutierrez B, Peralta-Perez MR y Zavala-Díaz De La Serna FJ: Revisión global de los contaminantes emergentes PBDE y el caso particular en México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 31 (3) 311-320, 2015
- 21) Siddiqi M.A., Laessing R. y Reed K. (2003). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): New pollutants – Old diseases. *J. Clin. Med. Res.* 1, 281-290.
- 22) ATSDR (2004). Toxicological profile for polybrominated biphenyl and polybrominated diphenyl ethers. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services [en línea]. <http://www.atsdr.cdc.gov/PHS/PHS>.
- 23) USEPA (2007). Method 1614 brominated diphenyl ethers in water soil, sediment and tissue by HRGC/HRMS. Office of Water, United States Environmental Protection Agency. Método. Washington, DC, EUA, pp. 1-84.
- 24) Ikonomou M.G., Rayne S., Fischer M., Fernández M.P. y Cretney W. (2002). Occurrence and congener profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental samples from coastal British Columbia, Canada. *Chemosphere* 46, 649-663.
- 25) USEPA (2014). EPA 505-F-14-006. Technical fact sheet polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polybrominated biphenyls (PBBs). Office of Solid Waste and Emergency Response. Hoja Técnica. Washington, DC, EUA, pp. 1-7.
- 26) Vives, I., Joan, O., Grimal, T., Guitart, R., “Los Hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud Humana”, *Apuntes de Ciencia y Tecnología*, 2001, 3(2), 45-51.
- 27) Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *J Microcolumn Sep* 1999a;11:737-47.

- 28) David F, Sandra P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *J Chromatogr A* 2007;1152:54–69.
- 29) Prieto A, Basauri O, Rodil R, Usobiaga A, Fernandez LA, Etxebarria N, et al. Stir-bar sorptive extraction: a view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *J Chromatogr A* 2010;1217:2642–66
- 30) Roy G, Vuillemin R, Guyomarch J. On-site determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seawater by stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC–MS. *Talanta* 2005;66:540–6.
- 31) Grob, K.; Making and manipulating capillary columns for gas chromatography, Hüthig Heidelberg, 1986, p. 232.
- 32) P. S. Chatzopoulou and S. T. Katsiotis, Headspace analysis of the volatile constituents from *Juniperus communis* L. ‘berries’ (cones) grown wild in Greece, *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 3, (492-496), (2006).
- 33) Pettersson J, Roeraade J. Method for analysis of polar volatile trace components in aqueous samples by gas chromatography. *Anal Chem.* 2005 May 15;77(10):3365-71
- 34) B.V.BurgerZendaMunro. Headspace gas analysis : Quantitative trapping and thermal desorption of volatiles using fused-silica open tubular capillary traps. *Journal of Chromatography A*. Volume 370, 1986, Pages 449-464
- 35) Bauld T, Teasdale P, Stratton H, Uwins H. A fast stir bar sorptive extraction method for the analysis of geosmin and 2-methylisoborneol in source and drinking water. *Water Sci Technol.* 2007;55(5):59-67
- 36) León VM, Alvarez B, Cobollo MA, Muñoz S, Valor I. Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. I. Method optimisation. *J Chromatogr A*. 2003 May 30;999(1-2):91-101.
- 37) Hou Y, Yang L, Wang B, Xu J, Yang Y, Yang Y, Cao Q, Xie X. [Analysis of chemical components in tobacco flavors using stir bar sorptive extraction and thermal desorption coupled with gas chromatography-mass spectrometry]. *Se Pu.* 2006 Nov; 24(6):601-5.
- 38) Análisis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extracción-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry:
 - a. I. Method optimisation. (*Journal of Chromatography A*, 999 (2003) 91-101)V.M. León, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Muñoz, I.Valor. Labaqua S.A, Spain
 - b. II. Method validation. (*Analytica Chimica Acta* 558 (2006) 261-266) V.M. León, J. Llorca-Pórcel, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Muñoz, I.Valor. Labaqua S.A, Spain.
- 39) Pérez-Carrera E, León VM, Parra AG, González-Mazo E_ Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A* [14 Sep 2007, 1170(1-2):82-90]

- 40) Ochiai N, Sasamoto K, Kanda H, Nakamura S. Fast screening of pesticide multiresidues in aqueous samples by dual stir bar sorptive extraction-thermal desorption-low thermal mass gas chromatography-mass spectrometry, 2006, Gerstel Japan.
- 41) Selyanchyn R, Nozoe T, Matsui H, Kadosawa T. TD-GC-MS investigation of the VOCs released from blood plasma of dogs with cancer. *Diagnostics* 2013, 3, 68-83
- 42) M. Valcárcel Cases, A. Gómez Hens, Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverté S.A 1988 p.615-675
- 43) Hoffmann WD, 1 and Jackson GP. Forensic Mass Spectrometry. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2015. 8:21.1–21.22
- 44) Jansson C, Pihlström T, Österdahl B y Markides K E. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A.* 2004; 1023:93-104.
- 45) Toldrá F y Reig M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Sci & Technol.* 2006; 17:482-9.
- 46) Tekel J y Hatrck S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors. *J Chromatogr A.* 1999; 754:397-410.
- 47) <http://www.gerstel.es/es/Software.htm>
- 48) Valcarcel M, Ríos A. La calidad en los laboratorios analíticos. 1º ed. España: Reverte; 1992.
- 49) EPA METHOD 525.2. Determination of organic compounds in drinking water by liquid-solid extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry.